

· 论 著 ·

[文章编号]1000-8861(2012)08-0651-05

抗人 NRP1 单克隆抗体的活性鉴定及初步应用

倪二茹, 曾凡伟, 王生育, 曹 畅, 吕 莎, 张海鹏, 颜江华*

[摘 要] 目的 鉴定抗人神经菌毛素 1(neuropilin1, NRP1)单克隆抗体的生物活性并利用该抗体检测常见肿瘤细胞株 NRP1 蛋白的表达情况。方法 腹水法制备 4 株抗 NRP1 单克隆抗体并用 rProtein A 亲和柱纯化抗体, 间接 ELISA 检测 4 株抗体的滴度水平, Western blot 分析 4 株抗体结合 NRP1 蛋白的特异性, 流式细胞术分析 4 株抗体结合 NRP1 蛋白的亲和力, 共聚焦免疫荧光实验进一步验证抗体结合 NRP1 蛋白的能力; 细胞免疫组织化学染色检测 14 株肿瘤细胞表达 NRP1 蛋白的情况。结果 4 株抗体均能特异结合 NRP1 蛋白, 其中 A6 结合 NRP1 能力最强, 能结合在表达 NRP1 蛋白的细胞膜表面。细胞免疫组织化学染色结果显示 NRP1 在 HepG2、C6、HEK293、BEL-7402、MDA-MB-453 呈高水平表达, 在 U87、MGC803、MCF7、MDA-MB-231 中表达水平相对较弱, 而在 U251、BGC823、H6、HT-29 的表达介于两者之间, 在 SMMC-7721 细胞中未检测到表达。结论 4 株抗 NRP1 单克隆抗体均能特异结合 NRP1 蛋白, 多种肿瘤细胞株均不同程度表达 NRP1 蛋白, 为进一步探讨 NRP1 蛋白与肿瘤发生发展的关系奠定了基础。

[关键词] NRP1; 单克隆抗体; 特异性; NRP1 的表达; 免疫细胞化学染色

[中图分类号] R392.9

[文献标识码] A

Characterization and application of monoclonal antibodies against human NRP1

NI Erru, ZENG Fanfei, WANG Shengyu, CAO Chang, LÜ Sha, ZHANG Haipeng, YAN Jianghua

Cancer Research Center of Medical College, Xiamen University, Xiamen 361005, China

[Abstract] With the aim of exploring the roles of neuropilin-1 (NRP1) protein in tumor, we have established 4 anti-NRP1 monoclonal antibodies (mAbs) in our previous work, and will characterize these mAbs in the present study. Indirect ELISA, Western blot, flow cytometer and confocal immunofluorescence have been applied to determine the binding specificity and affinity of the mAbs with NRP1 on MDA-MB-453 cells. The results showed that the mAbs could specifically bind with NRP1 and the A6 mAb had the highest affinity with NRP1. Then the A6 mAb was applied to investigate the expression of NRP1 on 14 cancer cell lines in immunocytochemical detection. Results indicated that NRP1 was highly expressed on HepG2, C6, HEK293, BEL-7402, MDA-MB-453, moderately expressed on U251, BGC823, H6, HT-29, lowly expressed on U87, MGC803, MCF7, MDA-MB-231, and little expressed on SMMC-7721. The common expression of NRP1 in cancer cell lines would help to elucidate the correlation of the NRP1 expression to oncogenesis and these mAbs against NRP1 may play a vital role in anticancer therapy including drug exploitation.

[Key words] NRP1; Monoclonal antibody; Specificity; NRP1 expression; Immunocytochemistry

人神经菌毛素 1(neuropilins1, NRP1)是一种新型的多功能受体,作为神经丛蛋白(plexin)的共受体参与神经细胞导向和轴突生长的调控^[1-2];同时也作为血管内皮生长因子受体(vascular endothelial growth factor receptor, VEGFR)的共受体对内皮细胞的活化、增殖与迁移进行调控^[3-4];最近的研究发现 NRP1 受体有独立的信号通路^[5],可参与肿瘤细胞的恶性表型调控。已有研究结果表明阻断 NRP1 与 VEGF 的结合,既能直接抑制肿瘤的生长,又能通过抑制肿瘤血

管的生成间接抑制肿瘤的生长^[6]。因此, NRP1 被认为是继 VEGF 后又一重要的抗肿瘤新靶标。

NRP1 蛋白的结构由胞内区、跨膜区和胞外区 3 部分组成,其中胞外区包括 860 个氨基酸,由 3 个不同的结构域组成,分别称为 a1a2、b1b2 和 c。其中 b1b2 结构域是与 VEGF165 结合所必需的结构域^[7-8],因此本实验室前期的工作主要包括利用 RT-PCR 技术获得 NRP1 蛋白 b1b2 结构域(NRP1/b1b1)的基因并克隆到原核表达载体 pET-22b(+)中,将重组质粒转化到 *E. coli* Rosetta 中,诱导表达得到 NRP1/b1b2 融合蛋白作为免疫原,建立了 4 株能稳定分泌抗 NRP1/b1b2 单克隆抗体的杂交瘤细胞株^[9]。

本文在前期工作的基础上,鉴定了 4 株抗人

基金项目:国家自然科学基金(30973485);福建省属公益类科研专项经费(2011R1039-1)

作者单位:361005,厦门大学医学院抗癌研究中心

* 通信作者:颜江华, Tel:0592-2180587, E-mail: jhyan@xmu.edu.cn

NRP1 单克隆抗体的生物学活性,并利用该抗体检测多种肿瘤细胞株中 NRP1 蛋白的表达,为进一步探讨 NRP1 蛋白与肿瘤发生发展的关系奠定了基础。

1 材料与方法

1.1 主要试剂与材料 rProtein A 为 Sepharose™ 产品。RPMI-1640 和 DMEM 为 Gibco 产品。胎牛血清为杭州四季青生物工程公司产品。羊抗鼠 HRP-IgG、羊抗鼠 FITC-IgG 和羊抗鼠 TRITC-IgG 为 SIGMA 公司产品。Hoechst 染色试剂盒为碧云天产品。ABC 检测试剂盒和 DAB 显色试剂盒为中杉金桥产品。本文所使用的细胞株均为本实验室保存的细胞株。

1.2 抗体的制备和纯化

1.2.1 抗体的制备 腹水法。常规培养建立的 4 株抗 NRP1 杂交瘤细胞。将高压 (121 °C, 20 min) 灭菌的石蜡油注射到 Balb/c 小鼠腹腔, 0.5 ml/只, 1~2 周后每只小鼠腹腔注射 2×10^6 个杂交瘤细胞, 注射细胞 7~10 d 后, 当小鼠腹部膨胀且行动迟缓时抽取腹水, 37 °C 温箱孵育 1 h 后, 3 000 r/min 离心 10 min, 弃去脂肪, 收集中间澄清腹水, 分装冻存备用。

1.2.2 抗体的纯化 亲和层析法。方法如下: 1) 用 Buffer A (0.05 mol/L Boric acid, 4.0 mol/L NaCl, pH 9.0) 平衡柱子; 2) 加少量的腹水, 用 Buffer A 冲洗柱子; 3) 再用 Buffer B (0.05 mol/L Sodium phosphate, 0.05 mol/L Sodium citrate, 0.3 mol/L NaCl, pH 3.0) 洗脱; 4) 收集蛋白加入 5% 体积的 1.0 mol/L Tris-HCl (pH 8.0) 调节 pH 值; 5) 收集蛋白行 SDS-PAGE 变性电泳进行纯度测定。

1.3 抗体的鉴定

1.3.1 间接 ELISA 方法如下: 1) 用表达纯化的 NRP1/b1b2 融合蛋白以 5 µg/ml 的浓度包被酶标板, 100 µl/孔, 4 °C 包被过夜; 2) PBST 洗涤 3 次, 每次 3 min; 3) 1% 的明胶封闭, 200 µl/孔, 37 °C, 1 h; 4) PBST 洗涤 3 次, 每次 3 min; 5) 将 4 株抗体的浓度都调成 1 mg/ml, 分别按 1:10、1:100、1:1 000、1:10 000 和 1:100 000 稀释后每孔加 100 µl, 37 °C 反应 1 h; 同时设立阴性对照和空白对照; 6) PBST 洗涤 3 次, 每次 3 min; 7) 加入羊抗鼠 HRP-IgG (1:10 000 稀释), 100 µl/孔, 37 °C, 1 h; 8) PBST 洗涤 4 次, 每次 3 min; 9) 加入 OPD 底物溶液, 50 µl/孔, 37 °C, 30 min; 每孔立即滴加 50 µl 终止液, 酶标仪测定各孔在 490 nm 处的光密度值 ($OD_{490\text{ nm}}$)。

1.3.2 Western blot 分析 方法如下: 1) 取人乳腺癌细胞株 MDA-MB-453 和人乳腺导管瘤细胞 BT-474^[10] 的总蛋白提取物分别加样于凝胶上, 经常规 12% SDS-

PAGE 电泳后, 凝胶行 100 V 电压湿转 100 min 至 PVDF 膜; 2) 5% 脱脂奶粉封闭 PVDF 膜, 4 °C 过夜; 弃去封闭液, PBST 洗 3 次, 每次 5 min; 3) 将 PVDF 膜按泳道剪切, 放入 4 个干净的培养皿中, 分别加入 1:1 000 抗体稀释液稀释的 4 株抗体, 室温反应 2 h, PBST 洗 3 次, 每次 5 min; 4) 加入 1:3 000 稀释的羊抗鼠 HRP-IgG, 室温反应 1 h, PBST 洗 3 次, 每次 5 min; 5) ECL 显色并观察记录结果。

1.3.3 流式细胞术分析 方法如下: 1) 常规培养 MDA-MB-453 细胞, PBS 洗涤离心 3 遍收集于 5 个 EP 管, 每个 EP 管细胞数目约为 5×10^5 个; 2) 每个 EP 管加 4% 多聚甲醛 1 ml, 室温固定 30 min, PBS 洗涤离心 3 遍; 3) 5 个 EP 管分别加入 1 ml PBS, 1 ml B6, A3, B3, A6 抗体, 其中 4 株抗体的浓度均为 30 µg/ml, 37 °C 反应 1 h, PBS 洗涤离心 3 遍; 4) 每个 EP 管加 1 ml 1:50 稀释的羊抗鼠 FITC-IgG 二抗, 37 °C 反应 1 h, PBS 洗涤离心 3 遍; 5) 每个 EP 管加 1 ml PBS 混悬细胞, 上机操作。

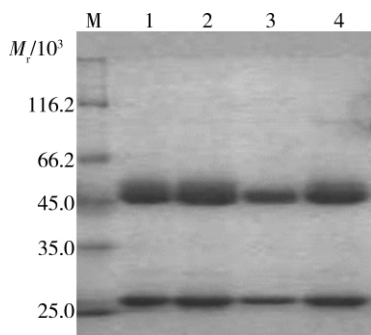
1.3.4 细胞免疫荧光分析 方法如下: 1) 取适量 MDA-MB-453 细胞于盖玻片贴壁生长, 4 °C 预冷的 PBS (pH=7.4) 洗涤 3 次; 2) 加入 Hoechst 染色试剂盒的固定液 0.5 ml, 4 °C 30 min; 弃掉固定液, 用 PBS 洗 3 遍, 每次 3 min, 吸尽液体; 3) 在培养板加入 1:100 稀释的 A6 抗体或等体积的 PBS, 37 °C 孵育 1 h; 弃掉一抗溶液, 用 PBS 洗 3 遍, 每次 3 min, 吸尽液体; 4) 在培养板加 1:50 稀释的羊抗鼠 TRITC-IgG 二抗, 37 °C 避光孵育 1 h, 弃掉荧光二抗, 用 PBS 洗 3 遍, 每次 3 min, 吸尽液体; 5) 加入 0.5 ml Hoechst 33258 染色液, 室温染色 5 min, 摇床晃动; 弃掉染色液, 用 PBS 洗涤 3 遍, 吸尽液体; 6) 滴 1 滴抗荧光淬灭封片液于载玻片上, 盖上贴有细胞的盖玻片, 尽量避免气泡; 7) 共聚焦扫描显微镜下观察, 其中 Hoechst 33258 激发波长在 350 nm 左右, 发射波长在 460 nm 左右; 而 TRITC 最大吸引光波长为 550 nm, 最大发射光波长为 620 nm, 拍摄相关图片。

1.4 抗体的应用 从 4 株抗体中选取亲和力最高的一株作为检测试剂, 探讨多种肿瘤细胞 NRP1 的表达情况, 采用免疫细胞化学染色法。方法如下: 1) 细胞爬片: 取适量培养的细胞滴于盖玻片上, 待其均匀贴壁生长至约 50% 左右, 用 4% 多聚甲醛固定细胞 30 min, PBS 洗 3 遍; 2) 灭活内源性过氧化物酶: 细胞于 0.3% H_2O_2 溶液孵育 30 min, PBS 洗 3 遍; 3) 封闭非特异性蛋白: 在盖玻片上滴加 5% 羊血清, 室温 30 min; 4) 一抗孵育: 甩去切片上的羊血清, 滴加 A6 抗体 (1.0 mg/ml, 1:100 稀释), 放入湿盒中室温静置 1 h, 然后 4 °C 过夜, 后于 37 °C 复温 45 min, PBS 洗 5 遍; 5) 二抗孵

育:滴加羊抗鼠 HRP-IgG,于 37 °C 恒温箱中孵育 45 min, PBS 洗 5 遍; 6)SP 反应:滴加入链霉菌抗生物素蛋白-过氧化酶,于 37 °C 恒温箱中 45 min, PBS 洗 5 遍; 7)显色:加入新配置的 DAB,显色 5-10 min, PBS 洗 3 遍,双蒸水洗 5 遍; 8)复染、脱水、透明、封片:加入苏木素染液染色 1 min,自来水冲洗,双蒸水洗 5 min,再用 PBS 返蓝 5 min。70%、80%、95%、100%、100% 乙醇各浸泡 2 min,进行脱水,用二甲苯透明 2 min×2 次,中性树胶封片。

2 结果

2.1 抗体的制备和纯化 腹水经 rProtein A 亲和层析纯化, SDS-PAGE 凝胶电泳扫描鉴定其纯度为 95% 以上(图 1)。4 株抗体均在在相对分子质量为 50 000 和 25 000 处呈现 2 条带,分别相当于抗体的重链和轻链的相对分子质量,表明通过纯化,得到较高纯度的抗体。



M) Protein marker; 1) B6; 2) A10; 3) B3; 4) A6.

图 1 SDS-PAGE 电泳分析 4 株抗体腹水经 rProtein A 纯化后的纯度

Fig 1 SDS-PAGE analysis of the 4 mAbs after purification

2.2 抗体的鉴定

2.2.1 间接 ELISA 间接 ELISA 结果如图 2 所示, 4 株抗体随着抗体浓度的下降,在 490 nm 波长处的吸光度值都逐渐降低,表明这 4 株抗体能与包被在板上的 NRP1/b1b2 融合蛋白进行特异性结合,且这 4 株抗体的效价在 1×10^5 。但是,在浓度相同的条件(1 mg/ml)下,这 4 株抗体的 OD 值存在差异,其中 A6 的 OD 值最高,其次是 B3 和 A10, B6 的最低。

2.2.2 Western blot 分析 人乳腺癌细胞株 MDA-MB453 和人乳腺导管瘤细胞 BT-474 裂解液的 Western blot 分析结果如图 3 所示,其中泳道 1,3,5,7 上样的是 MDA-MB-453 细胞裂解液;泳道 2,4,6,8 上样的是阴性对照细胞株 BT-474 裂解液,文献^[10]报道该细胞株低表达 NRP1 蛋白。蛋白转移到 PVDF 膜后,泳道 1 和 2,泳道 3 和 4,泳道 5 和 6 以

及泳道 7 和 8 分别用相同浓度(1 mg/ml)的 B6, A10, B3 和 A6 按 1:1 000 稀释后孵育。图 3 显示 4 株抗体均能识别 MDA-MB-453 细胞的相对分子质量 130 000 和 100 000 左右的蛋白条带,而在低表达 NRP1 的 BT-474 细胞泳道上则没有识别的条带,且 4 株抗体均不结合膜中的其他蛋白。此结果表明这 4 株抗体能够很好地识别细胞中的全长 NRP1 蛋白(相对分子质量 130 000 左右),可能也结合可溶性的 NRP1 蛋白或者 NRP1 异构体(相对分子质量 100 000 左右)。

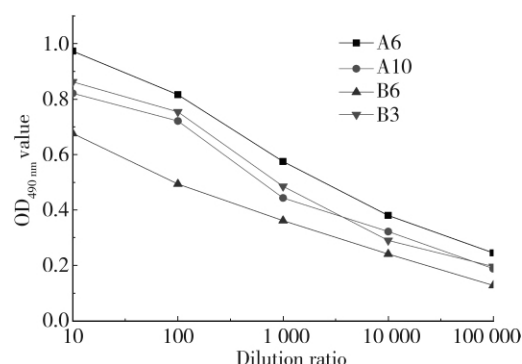
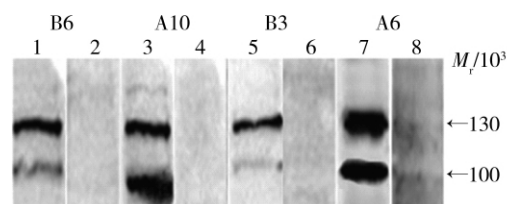


图 2 间接 ELISA 分析 4 株抗体的效价

Fig 2 Indirect ELISA analysis of the 4 mAbs



1, 3, 5, 7) MDA-MB-453 cell lysate; 2, 4, 6, 8) BT-474 cell lysate.

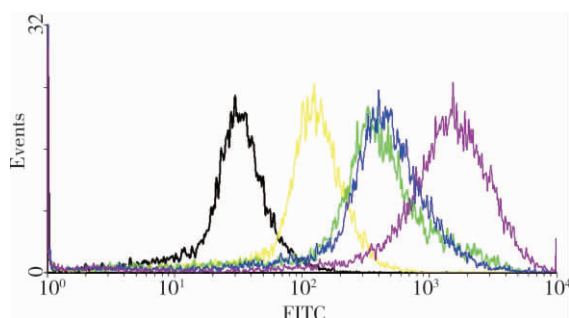
图 3 Western blot 分析 4 株抗体识别 NRP1 蛋白的特异性

Fig 3 Western blot analysis for the binding specificity of the 4 mAbs with NRP1 in MDA-MB-453 and BT-474 cell lysate

2.2.3 流式细胞术分析 4 株抗体结合 MDA-MB-453 细胞的亲和力的结果如图 4 所示, 4 株抗体孵育后的细胞其荧光强度均大于空白对照组(黑色曲线), A6 抗体孵育的细胞荧光强度(紫色曲线)最强, B6(黄色曲线)最弱, A10(绿色曲线)和 B3(蓝色曲线)相近, 介于 A6 和 B6 之间。图 4 表明 4 株抗体均能结合到 MDA-MB-453 细胞上, 且在相同抗体浓度和相同的反应条件下, 其结合的亲和力大小存在差别, A6 亲和力最强, B6 亲和力最弱, A10 和 B3 介于上述二者之间。

2.2.4 细胞免疫荧光分析 MDA-MB-453 细胞的免疫荧光染色结果见图 5。当使用 350 nm 做激发光, 检测 Hoechst 33258 的荧光时, 可见细胞核带有蓝色荧光, 且未对细胞核的形态造成损伤; 当使用 550 nm 做激发光, 检测 TRITC 的荧光时, 对照组的细胞检测不到红色荧光, 而加入 A6 抗体的细胞可以看到清晰

的红色荧光;经 2 种荧光叠加,未加抗体的细胞膜未出现红色荧光,而加入 A6 抗体的可见红色荧光,且主要呈现在细胞膜上。结果表明,我们的 NRP1 mAb 可以很好的与 MDA-MB-453 细胞表面的 NRP1 结合。



The control is colored in black, B6 in yellow, A3 in green, B3 in blue and A6 in purple.

图 4 流式细胞术分析 4 株抗体对 MDA-MB-453 细胞特异性结合的能力

Fig 4 Evaluation of the 4 mAbs binding to MDA-MB-453 by Flow CytoMeter

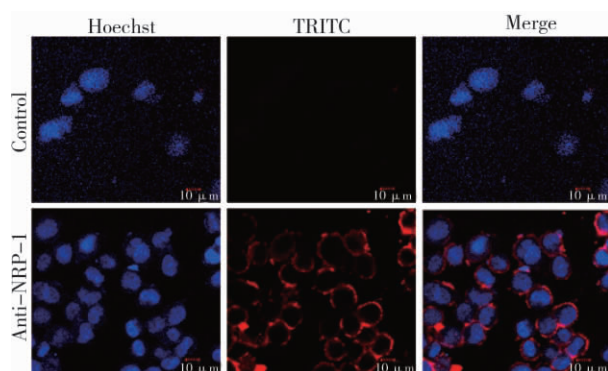


图 5 共聚焦免疫荧光分析

Fig 5 Confocal immunofluorescent analysis on MDA-MB-453 cells using A6 monoclonal antibody

2.3 免疫细胞化学染色检测抗体的应用 以 A6 mAb 作为检测试剂,对多种肿瘤细胞 NRP-1 蛋白进行细胞化学染色,其结果如表 1 和图 6 所示。细胞的染色结果按着色强度判定,(-)为不着色;(+)为弱阳性,呈淡棕黄色,颗粒细致疏散;(+++)为强阳性,呈深棕黄色,颗粒粗大密集;((+))介于(+)和(+++)之间。表 1 总结了 14 株肿瘤细胞的免疫组织化学染色结果,在所检测的 13 株细胞中,其表面均染有棕黄色,不同细胞着色强度不一,提示不同的细胞株表达 NRP1 蛋白的高低不同。人肝癌细胞 SMMC-7721 的染色结果为(-),提示该细胞株低表达或者不表达 NRP1 蛋白。图 6 所示为其中几株细胞的镜下结果,其结果显示细胞株的染色产物主要定位于细胞膜,少部分定位于细胞浆,呈弥漫性淡黄到棕黄色颗粒;而阴性对照(一抗为 Anti-CD34 抗体)均无棕黄色的着色。

表 1 常见肿瘤细胞株表达 NRP1 蛋白的情况

Tab 1 Immunocytochemistry staining on cells with A6 mAb

Cell	Results of staining	Cell	Results of staining
HepG2	+++	H6	++
BEL-7402	+++	U251	++
C6	+++	MDA-MB-231	+
HEK 293	+++	U87	+
MDA-MB-453	+++	MGC 803	+
HT-29	++	MCF7	+
BGC823	++	SMMC-7721	-

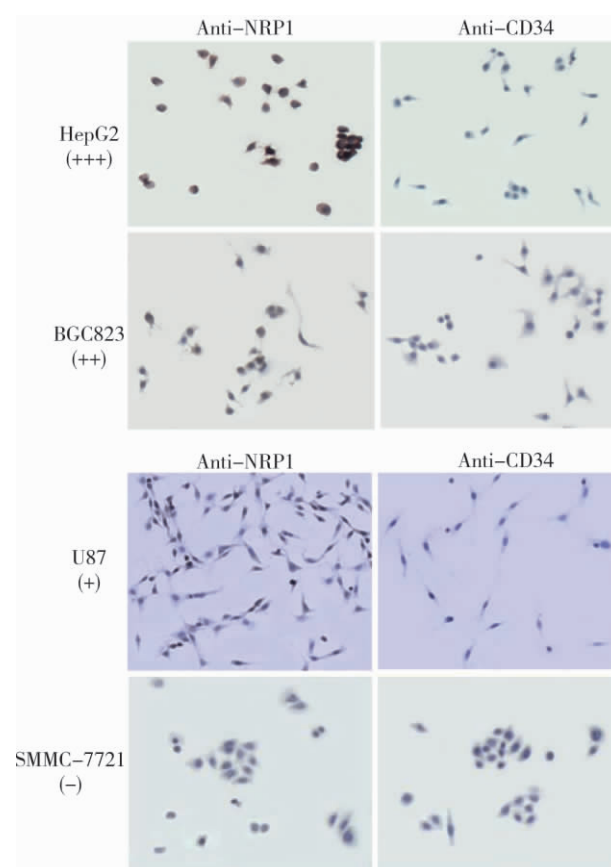


图 6 几种常见细胞株免疫组织化学染色结果(×400)

Fig 6 Immunocytochemistry staining on cells with A6 mAb (×400)

3 讨论

本文 Western blot 的实验结果显示 4 株抗体能够特异结合人胃癌细胞 BGC 823 总蛋白中的相对分子质量为 130 000 的 NRP1 和 100 000 的 NRP1,这里的相对分子质量为 100 000 的 NRP1 可能是可溶性 NRP1 或者 NRP1 异构体。据 Rossignol^[15]和 Tao^[16]的报道,有 4 种 NRP-1 mRNA 的异构体,这些异构体的大小从 551 到 704 个氨基酸残基不等。

为了观察 NRP1 在细胞株的表达情况,我们使用

免疫细胞化学染色方法检测 14 株肿瘤细胞中 NRP1 的表达情况, 结果显示多种肿瘤细胞均有不同程度的 NRP1 表达。已有研究表明, NRP1 广泛表达在多种肿瘤组织中, 包括人神经胶质瘤^[11]、乳腺癌^[12-13]、结肠癌^[14-15]和胃癌^[16-17]。我们的结果进一步支持了这一观点。NRP1 在非血管正常组织中的表达是有限的, 而在肿瘤组织中却是广泛表达, 提示该蛋白对肿瘤的发生发展起着重要的作用。

值得说明的是, 由于 A6 mAb 是以人源的 NRP1/b1b1 蛋白作为免疫原获取的, 故该抗体主要结合人源的 NRP1 蛋白。但是大鼠神经胶质瘤细胞 C6 同样能够在免疫细胞化学染色中呈现+++的结果, 提示我们的 A6 mAb 同样能结合大鼠的 NRP1。对这个交叉反应的问题, 我们将作进一步的探讨。

总之, 本实验制备的 NRP1 mAbs 在 Western blot、流式细胞术及共聚焦免疫荧光实验的结果表明, 4 株 NRP1 mAbs 均能特异结合 NRP1 蛋白, 该抗体有望在未来发展为具有抗肿瘤疗效的药物。免疫细胞化学染色结果显示多种肿瘤细胞株均不同程度表达 NRP1 蛋白, 为进一步探讨 NRP1 蛋白与肿瘤发生发展的关系奠定了基础。

【参考文献】

- [1] Luo Y, Raible D, Raper IA. Collapsin: a protein in brain that induces the collapse and paralysis of neuronal growth cones[J]. *Cell*, 1993, 75(2): 217-227.
- [2] He Z, Tessier Lavigne M. Neuropilin is a receptor for the axonal chemorepellent Semaphorin [J]. *Cell*, 1997, 90(4): 793.
- [3] Soker S, Takashima S, Miao HQ, et al. Neuropilin-1 is expressed by endothelial and tumor cells as an isoform-specific receptor for vascular endothelial growth factor[J]. *Cell*, 1998, 92(6): 735-745.
- [4] Stephenson JM, Banerjee S, Saxena NK, et al. Neuropilin-1 is differentially expressed in myoepithelial cells and vascular smooth muscle cells in preneoplastic human breast: a possible marker for the progression of breast cancer[J]. *Int J Cancer*, 2002, 101(5): 409-414.
- [5] Cai H, Reed RR. Cloning and characterization of neuropilin-1-interacting protein: a PSD-95/DlgZO-1 domain-containing protein that interacts with the cytoplasmic domain of neuropilin-1[J]. *Neurosci*, 1999, 19(15): 6519-6527.
- [6] Pan Q, Chantry Y, Liang WC, et al. Blocking neuropilin-1 function has an additive effect with anti-VEGF to inhibit tumor growth[J]. *Cancer Cell*, 2007, 11(1): 53-67.
- [7] Lee CC, Kreusch A, McMullan D, et al. Crystal structure of the human neuropilin-1 b1 domain[J]. *Structure*, 2003, 11(1): 99-108.
- [8] 裴向克, 石炳毅. Neuropilin-1 研究进展[J]. *免疫学杂志*, 2007, 23(5): 580-582.
- [9] Xiang L, Fanghong L, Shengyu W, et al. Monoclonal antibody against NRP-1 b1b2 [J]. *Hybridoma (Larchmt)*, 2011, 30(4): 369-373.
- [10] Lee TH, Seng S, Sekine M, et al. Vascular endothelial growth factor mediates intracrine survival in human breast carcinoma cells through internally expressed VEGFR1/FLT1[J]. *PLoS Med*, 2007, 4(6): 1101-1116.
- [11] Rieger J, Wick W, Weller M. Human malignant glioma cells express semaphorins and their receptors, neuropilins and plexins[J]. *Glia*, 2003, 42(4): 379-389.
- [12] Stephenson JM, Banerjee S, Saxena NK, et al. Neuropilin-1 is differentially expressed in myoepithelial cells and vascular smooth muscle cells in preneoplastic and neoplastic human breast: A possible marker for the progression of breast cancer[J]. *Int J Cancer*, 2002, 101(5): 409-414.
- [13] Ghosh S, Sullivan CA, Zerkowski MP, et al. High levels of vascular endothelial growth factor and its receptors (VEGFR-1, VEGFR-2, neuropilin-1) are associated with worse outcome in breast cancer[J]. *Hum Pathol*, 2008, 39(12): 1835-1843.
- [14] Parikh AA, Fan F, Liu WB. Neuropilin-1 in human colon cancer: Expression, regulation, and role in induction of angiogenesis[J]. *Am J Pathol*, 2004, 164(6): 2139-2151.
- [15] Ochiuni T, Kitadai Y, Tanaka S, et al. Neuropilin-1 is involved in regulation of apoptosis and migration of human colon cancer[J]. *Int J Oncol*, 2006, 29(1): 105-116.
- [16] Akagi M, Kawaguchi M, Liu W, et al. Induction of neuropilin-1 and vascular endothelial growth factor by epidermal growth factor in human gastric cancer cells[J]. *Br J Cancer*, 2003, 88(5): 796-802.
- [17] Hansel DE, Wilentz RE, Yeo CJ, et al. Expression of neuropilin-1 in high-grade dysplasia, invasive cancer, and metastases of the human gastrointestinal tract[J]. *Am J Surg Pathol*, 2004, 28(3): 347-356.

(收稿日期: 2012-01-18; 修回日期: 2012-05-25)

(编辑 汤玉瑜)